** 2011年 12月改訂 (第6版)
* 2010年 5月改訂 (第5版)

この使用説明書をよく読んでから使用してください

研究用試薬

ADAMTS13活性測定試薬

【はじめに】

ADAMTS13 (A Disintegrin-like and Metalloproteinase with ThromboSpondin type 1 motif 13) は止血因子であるvon Willebrand因子 (VWF) を特異的に切断する酵素 (VWF-cleaving protease) です。ADAMTS13の基質であるVWFは血漿糖蛋白であり、血管壁の損傷によって露出したコラーゲンや、血小板表面の受容体蛋白質に結合することによって、血小板を凝集させる働きを持ちます。通常、ADAMTS13により、VWFが部分的に切断されることによって正常な止血機能が維持されていますが、何らかの原因でADAMTS13活性が低下すると、血液中に過剰のVWFが蓄積して血小板凝集による血栓を起こし易くなり、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP : Thrombotic Thrombocytopenic Purpura) を発症すると考えられています。

ADAMTS13の最小基質であるVWF-A2ドメインの73アミノ酸残基 (VWF73) に蛍光基を導入したFRETS-VWF73による測定法が開発され、さらにADAMTS13によって切断されて生じるVWF-A2断端アミノ酸Tyr1605を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたELISA法による新規な活性測定法が確立されました。

【全般的な注意】

1) 本製品は研究用試薬です。診療上の診断に用いることはできません。
2) 使用説明書に記載以外の使用方法については保証を致しません。
3) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
4) 本製品の非働化血漿はヒト由来血漿を使用しています。HBs抗原、HCV抗体及びHIV-1抗体及びHIV-2抗体の検査を行い、陰性の結果を得ておりますが、感染の危険性を完全に否定できる検査法がありません。また、それ以外のウイルスに関する検査はしておりませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分注意してください。

【形状・構造等 (キットの構成)】

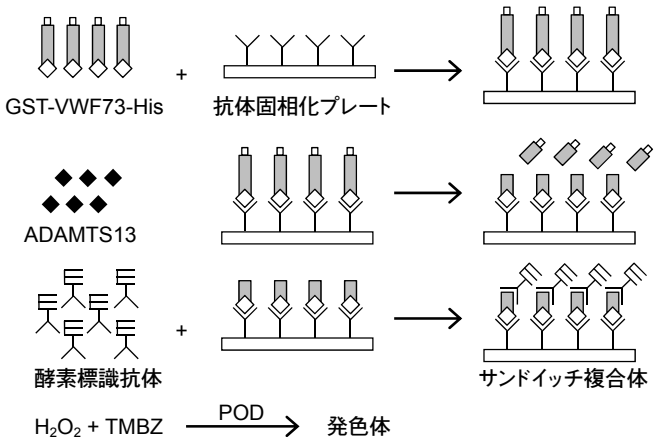
1. 抗体固相化プレート (Anti-GST Antibody coated Microplate):
   抗 GST マウスモノクローナル抗体
2. VWF73 基質 (VWF73 Substrate):GST-VWF73-His
3. 反応用緩衝液 (Reaction Buffer)
4. 酵素標識抗体液 (HRP conjugated Antibody):
   ペルオキシダーゼ結合マウスモノクローナル抗 N10 抗体
5. 発色液 (Color Reagent):
   3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、尿素過酸化水素
6. 洗浄原液 (Wash Buffer Concentrate)
7. 反応停止液 (Stop Solution):0.5 mol/L 硫酸
8. 非働化血漿 (Inactivated Plasma)
9. 希釈用プレート (Sample Dilution Microplate)
10. プレートシール (Plate Sealer)

【使用目的】

血漿中のADAMTS13活性の測定

**【測定原理】

1. 原理
   本法は固相サンドイッチ法に基づいています。
   マイクロプレートに固相されている抗GSTマウスモノクローナル抗体にVWF73基質 (GST-VWF73-His) を反応させ、検体中のADAMTS13によりVWF73基質を切断させます。さらにペルオキシダーゼ結合マウスモノクローナル抗N10抗体 (酵素標識抗体) と反応させると、切断生成物をはさんだ3者のサンドイッチ複合体が形成されます。
   固相に結合するペルオキシダーゼ (POD) の量はADAMTS13活性に比例するので、尿素過酸化水素 (H_2O_2) 及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) を基質として用い、遊離するTMBZ酸化物 (発色体) を比色定量することにより、検体中のADMTS13活性を求めます。



2. 特徴 [1)]
   1) SDSアガロース電気泳動法との相関が良好で、操作性と安定性に優れています。
   2) 最小検出感度は0.5%と高感度です (正常検体の活性値を100%とした場合)。

**【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法
   1) 本製品による測定には、検体としてクエン酸血漿を使用してください。
   2) 新鮮な検体を使用してください。検体の保存が必要な場合は-20℃以下で凍結保存してください。
2. 妨害物質・妨害薬剤
   1) ADAMTS13はメタロプロテアーゼです。EDTAにより活性が阻害されるため、使用しないでください。
   2) トロンビンによるADAMTS13の分解が報告されています。血清検体は避けてください。
3. その他
   1) 検量線は測定毎に作成してください。
   2) 多検体を測定する場合は、各反応時間を定められた時間に統一するよう注意してください。特にADAMTS13による切断時間を一定にするため、操作手順とおりに検体等をあらかじめ希釈してからウェルに添加してください。
   3) 希釈用プレートは特別な処理をしたものではありませんので、不足した場合は市販のポリスチレンプレート等を使用してください。

【用法・用量 (操作法)】

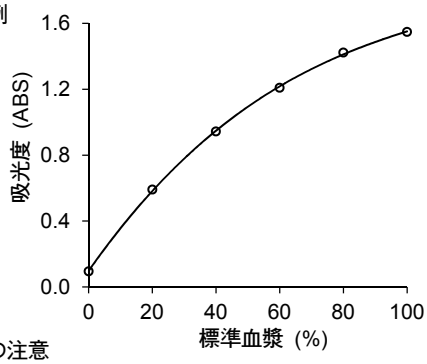
1. 試薬の調製方法
   1) 抗体固相化プレート、反応用緩衝液、酵素標識抗体液、発色液、反応停止液:
      室温に戻してからそのまま使用してください。
   2) VWF73基質液:
      VWF73基質1本に精製水6 mLを加え、転倒混和して完全に溶解してください。溶解後、保存する場合は凍結保存してください。凍結融解は5回まで使用可能です。
   3) 洗浄液:
      精製水を用いて洗浄原液を10倍希釈してください。結晶が析出することがありますが、性能には影響ありません。恒温槽で加温し溶解してから使用してください。
   4) 非働化血漿、希釈用プレート:
      そのまま使用してください。
   5) 標準血漿:
      非働化血漿を標準血漿0%、健常人血漿 (クエン酸血漿) を標準血

漿100%として使用してください。(標準血漿100%は、5～10人の血漿をプールして作成するのが望ましい)
標準血漿は非働化血漿を用いて、各活性値に希釈し (活性値は0、20、40、60、80、100%を推奨します)、調製してください。調製後の標準血漿は、その日のうちに使用してください。

2. 必要な器具･器材･試料等
   1) マイクロピペット、分注器
   2) マイクロプレート用の汎用分光光度分析装置 (波長：450 nm)
3. 測定法
   1) 抗体固相化プレートの各ウェルにVWF73基質液を100 μLずつ加え、プレートにシールをして、室温で1時間静置する。
   2) 希釈プレートを使用し、検体及び標準血漿を反応用緩衝液で31倍に希釈する。(例：検体及び標準血漿5 μL、反応用緩衝液150 μL)
   3) 1)の操作後、反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μLずつ加え、洗浄液を除去する。この操作を3回行った後、ペーパタオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去する。
   4) 2)で調製した希釈検体及び標準血漿を100 μLずつ加え、プレートにシールをして、室温で30分間静置する。
   5) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μLずつ加え、洗浄液を除去する。この操作を3回行った後、ペーパタオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去する。
   6) 各ウェルに酵素標識抗体液を100 μLずつ加え、プレートにシールをして、室温で1時間静置する。
   7) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μLずつ加え、洗浄液を除去する。この操作を3回行った後、ペーパタオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去する。
   8) 各ウェルに発色液を100 μLずつ加え、室温で30分間遮光して静置する。
   9) 各ウェルに反応停止液を100 μLずつ加え、10分以内に波長450 nmで吸光度を測定する。

**【測定結果の判定法】

1. 判定法
   標準血漿0～100%より作成した検量線から、検体のADAMTS13活性を読み取ってください。
2. 検量線例



3. 判定上の注意
   1) 検体の濃度が測定範囲を越える場合は、検体を非働化血漿で希釈して再測定してください。
   2) 検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。測定値や測定結果に疑問がある場合は、再検査や希釈再検査、または他の検査方法により確認してください。

【性能】

1. 同時再現性
   同一検体を6回同時に測定するとき、測定値のC.V.値は10.0%以下です。
2. 測定範囲： 0.5～100%

**【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意
   1) 血清等の検体はHIV、HBV、HCV等の感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
   2) 試薬が誤って眼や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当を受けてください。特に、反応停止液には0.5 mol/Lの硫酸、発色液には尿素過酸化水素が含有していますので、取扱いには注意してください。
2. 使用上の注意
   1) 本製品は凍結を避け、貯法に従い保存してください。誤って凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないでください。
   2) 開封後の試薬は、蓋をしめて2～10℃で遮光保存してください。
   3) ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
   4) 異なるロットの構成試薬を組み合せて使用しないでください。
3. 廃棄上の注意
   1) 使用後の容器を廃棄する場合は、貴施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等を区別して処理してください。
   2) 本製品を廃棄する場合は、水質汚染防止法等の関連法規に従って処理してください。
   3) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
   4) 本製品にはケーソンCGを防腐剤として含有しています。廃棄する場合は大量の水と共に流してください。

【貯蔵方法･有効期間】

貯蔵方法 ： 2～10℃ 遮光保存
有効期間 ： 18ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

【包装単位】

製品名		管理コード	包装
ADAMTS13 活性測定試薬	抗体固相化プレート	CY-5000	96ウェル × 1
	VWF73基質		6 mL用× 2
	反応用緩衝液		30 mL× 1
	酵素標識抗体液		12 mL× 1
	発色液		12 mL× 1
	洗浄原液		53 mL× 1
	反応停止液		12 mL× 1
	非働化血漿		1 mL× 1
	希釈用プレート		96ウェル × 1
	プレートシール		3枚

【主要文献】

1) Gerritsen HE, Robles R, et al ： Blood, 98：1654-1661 (2001)
2) 藤村吉博 ： 別冊･医学のあゆみ 血液疾患 ver. 3：748-751 (2005)
3) Furlan M, Robles R, et al ： Blood, 87：4223-4234 (1996)
4) Kokame K, Matsumoto M, et al ： Blood, 103：607-612 (2004)
5) Kokame K, Nobe, et al ： Br J Haematol, 129：93-100 (2005)
6) Kato S, Matsumoto M, et al ： Transfusion, 46：1444-1452 (2006)
7) 松本雅則 ： 血栓止血学会誌, 17, 4：393-401 (2006)
8) 伊藤晋、他 ： 日本輸血細胞治療学会誌, 56, 1：27-35 (2010)

【問い合わせ先】

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
☎ 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

《本製品は国立循環器病研究センターのライセンスを受けています》

製造販売元
株式会社カイノス
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18 ☎ 03 (3816) 4485